

Efek antiinflamasi nonsteroid terhadap aktivitas glutathion S-transferase hati tikus Sprague-Dawley

Sudibyo Martono
Bagian Kimia Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

ABSTRACT

Sudibyo Martono – *Effect of nonsteroidal antiinflammatory agent on Sprague-Dawley rat's liver glutathione S-transferases activity*

Background: Glutathion S-transferase (GST) is a group of multifunction isoenzymes playing a role as katalisator in releasing inflammatory mediators prostaglandin and leukotrien. Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAID) such as pentagamavunon-O (Pgv-O), piroxicam, and mefenamic acid have antiinflammatory effect.

Aim of study: The study was to know the effect of pentagamavunon-O (Pgv-O), piroxicam and mefenamic acid on GST.

Materials and methods: The effects of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAID_s) piroxicam, mefenamic acid, and pentagamavunon-O (Pgv-O) *in vitro* on mu and pi classes of Sprague-Dawley rat's liver glutathione S-transferases (GST)-activity was studied. GST-activities was measured spectrophotometrically on the conjugation reaction between glutathione (GSH) and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (for representing the mu class of GST) or etachrynic acid (for representing the pi class of GST). The potency of inhibitory effect was stated as IC₅₀ value (the concentration of inhibitor resulting in 50 % inhibition of GST-activity).

Results: The result showed that piroxicam inhibited strongly the mu class of GST-activity with IC₅₀ value of 42.66 mM and inhibited weakly the pi class of GST-activity with IC₅₀ value of 100.79 mM. Mefenamic acid inhibited weakly the mu and pi classes of GST-activity with IC₅₀ values of 107.09 and 275,0 mM (extrapolated), respectively. In this research, Pgv-O was found to be the strongest inhibitor of the mu class of GST-activity with IC₅₀ value of 3.91 mM and did not inhibit the pi class of rat's liver GST-activity.

Conclusions: Based on the results, it can be concluded that the three NSAIDs studied, all showed the inhibitory effects of mu class of GST-activity in decreasing order of Pgv-O, piroxicam, and mefenamic acid. Three of them did not or very weakly inhibited the pi class of rat's liver GST-activity.

Key words: NSAIDs - glutathione S-transferase - pentagamavunon-O - 1,2-dikloro-4-nitrobenzene - etachrynic acid.

ABSTRAK

Sudibyo Martono – *Efek antiinflamasi nonsteroid terhadap aktivitas glutathion S-transferase hati tikus Sprague-Dawley*

Latar Belakang: Glutathion S-transferase (GST) merupakan kelompok isoenzim multifungsi yang berperan sebagai katalis pembentukan mediator inflamasi prostaglandin dan leukotrien. Senyawa-senyawa antiinflamasi non-steroid (AINS) seperti pentagamavunon-O (Pgv-O), piroksikam, dan asam mefenamat menunjukkan antiinflamasi.

Tujuan Penelitian: Mengetahui efek pentagamavunon-O (Pgv-O), piroksikam, dan asam mefenamat terhadap GST.

Bahan dan Cara: Efek obat antiinflamasi non steroid (AINS) piroksikam, asam mefenamat, dan pentagamavunon-O (Pgv-O) telah diuji secara *in vitro* terhadap aktivitas glutathion S-transferase (GST) kelas mu dan pi yang diisolasi dari hati tikus jantan Sprague-Dawley. Aktivitas GST diukur secara spektrofotometri pada reaksi konjugasi antara glutathion (GSH) dengan substrat 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) untuk merepresentasikan aktivitas GST kelas mu dan asam etakrinat (AE) untuk merepresentasikan aktivitas

GST kelas pi. Kekuatan penghambatan aktivitas GST dinyatakan dengan nilai IC_{50} (yaitu konsentrasi senyawa uji yang menghasilkan 50% penghambatan aktivitas GST).

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa piroksikam menghambat kuat aktivitas GST kelas mu ($IC_{50} = 42,66$ mM) dan menghambat lemah aktivitas GST kelas pi ($IC_{50} = 100,79$ mM). Asam mefenamat menghambat lemah GST kelas mu ($IC_{50} = 107,09$ mM) dan menghambat sangat lemah GST kelas pi ($IC_{50} = 275,0$ mM, ekstrapolasi). Pada penelitian ini Pgv-0 terbukti sebagai inhibitor paling kuat terhadap GST kelas mu ($IC_{50} = 3,91$ mM) dan tidak menghambat aktivitas GST kelas pi hati tikus.

Simpulan: Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa obat AINS yang diuji ketiganya menghambat GST kelas mu hati tikus jantan strain Sprague-Dawley dengan urutan kekuatan Pgv-0 > piroksikam > asam mefenamat dan ketiganya menghambat lemah atau tidak menghambat aktivitas GST kelas pi.

(B.I.Ked. Vol. 37, No.3: 121-126, 2005)

PENDAHULUAN

Glutation S-transferase (GST) merupakan kelompok isoenzim multifungsi yang berperan sebagai enzim katalitik pada detoksifikasi senyawa elektrofilik melalui konjugasi dengan glutation (GSH)¹ dan sebagai katalis pembentukan mediator inflamasi prostaglandin² dan leukotrien³. Senyawa-senyawa antiinflamasi nonsteroid (AINS) seperti Pentagamavunon-0 (Pgv-0), piroksikam, asam mefenamat menunjukkan efek antiinflamasi melalui beberapa mekanisme. Aktivitas Pgv-0 sebagai antiinflamasi melalui penghambatan siklooksigenase⁴, demikian pula piroksikam dan asam mefenamat⁵. Obat AINS lain seperti indometasin memiliki efek antiinflamasi melalui penghambatan siklooksigenase⁶ dan telah terbukti sebagai inhibitor GST⁷. Sementara AINS sulfasalazin menghalangi pembentukan leukotrien melalui penghambatan isoenzim GST⁸.

Dari uraian tersebut di atas, dapat dirumuskan permasalahan :

Apakah Pgv-0, piroksikam, dan asam metafenamat (yang tergolong ke dalam obat antiinflamasi dan aktivitasnya melalui penghambatan siklooksigenase) juga berefek terhadap aktivitas GST? Atas alasan ini penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek piroksikam, asam mefenamat, dan Pgv-0 sebagai obat golongan AINS terhadap aktivitas GST kelas mu dan pi yang diisolasi dari hati tikus Sprague-Dawley secara *in vitro*.

MANFAAT PENELITIAN

Bila benar ketiga obat antiinflamasi: piroksikam, asam metafenamat, dan Pgv-0 menghambat aktivitas GST, maka informasi ini dapat digunakan untuk

membantu menjelaskan mekanisme antiinflamasi ketiga obat tersebut.

METODOLOGI PENELITIAN

Untuk merepresentasikan aktivitas GST kelas mu digunakan substrat 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB), sedangkan untuk merepresentasikan aktivitas GST kelas pi digunakan substrat asam etakrinat (AE)⁹. Aktivitas GST diukur sebagai aktivitas katalitik pada reaksi konjugasi antara GSH dengan: DCNB atau AE secara spektrofotometri menurut metode Habig dkk.¹⁰.

1. Bahan penelitian

Pgv-0 hasil sintesis Laboratorium Molnas dan telah dikonfirmasi strukturnya¹¹. Asam mefenamat dan piroksikam (kualitas farmasetis, dari PT. Kimia Farma), Glutation (GSH), asam etakrinat, dan bovine serum albumin (Sigma Chemical Co). Substrat 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) (Aldrich). Dimetil-sulfoksida, etanol, kalium dihidrogen fosfat, dan dikalium hidrogen fosfat (kualitas p.a.E. Merck). Akuades buatan Fakultas Farmasi UGM.

Tikus putih jantan (Strain Sprague-Dawley) dan pakan tikus pelet dari Laboratorium Farmakologi Toksikologi Fakultas Farmasi UGM. Tip pipet berbagai ukuran (Gilson Pipetman)

2. Alat penelitian

Spektrofotometer Genesys-5 Milton Roy, pH Meter TOA HM-60S, ultrasentrifugator (Hitachi SCP 85H), neraca elektrik (Shimadzu, type LS-6DT) dan *delivery* pipet (Gilson).

3. Jalan penelitian

- a. Penyiapan fraksi sitosol yang mengandung (enzim) glutation S-transferase (GST) dari hati tikus.

Tikus putih jantan (strain Sprague-Dawley, berat 200-220 gram sebanyak sepuluh ekor ditempatkan dalam kandang dengan diberi minum air leideng *ad libitum* dan pakan pelet selama 7 hari. Tikus dipuasakan selama 24 jam sebelum dibunuh dan diambil hati untuk penyiapan fraksi sitosol yang mengandung enzim GST dengan metode sentrifugasi bertingkat menurut Lundgren dkk.¹². Kadar protein dalam GST ditetapkan secara spektrofotometri dengan metode Biuret menggunakan *bovine serum albumin* sebagai pembanding. Fraksi sitosol yang diperoleh disimpan pada suhu -80°C sampai saat digunakan.

- b. Penentuan aktivitas GST kelas mu hati tikus digunakan kondisi campuran inkubasi sbb.: (modifikasi Habig dkk., 1974).

Ke dalam kuvet (volume 1 mL) masukkan 645 μL 0,1 M bufer fosfat pH 7,5; 15 μL fraksi sitosol hati tikus kdr. prot. tt., 75 μL 50 mM GSH (dalam akuades), dan 15 μL 50 mM DCNB (dalam etanol).

Kuvet blanko berisi 750 μL 0,1 M bufer fosfat pH 7,5.

- c. Penentuan aktivitas GST kelas pi hati tikus digunakan kondisi campuran inkubasi sbb.: (modifikasi Habig dkk., 1974).

Ke dalam kuvet (volume 1 mL) masukkan 701,25 μL 0,1 M bufer fosfat pH 6,5; 15 μL fraksi sitosol hati tikus kdr. prot. tt., 18,75 μL 10 mM GSH (dalam akuades), dan 15 μL 10 mM asam etakrinat (dalam etanol).

Kuvet blanko berisi 750 μL 0,1 M bufer fosfat pH 6,5.

Catatan :

kdr. prot. tt : kadar protein tertentu yang menghasilkan *rate* linier.

Produk konjugat yang terbentuk: GS-CNB diukur pada λ 345 nm, sedangkan GS-AE diukur pada 1 270 nm, dari menit ke 0 hingga menit ke 3, pada suhu kamar menggunakan spektrofotometer (program *Simple kinetic*). Hasil pengukuran berupa *rate* (= Δ serapan per menit).

- d. Penentuan IC_{50} (konsentrasi Pgv-0 atau asam mefenamat atau piroksikam) yang menghasilkan 50 % penghambatan aktivitas GST hati tikus.

Cara percobaan :

Seperti pada butir 3b dan 3c, tetapi dengan penambahan Pgv-0 atau asam mefenamat atau piroksikam yang dilarutkan dalam pelarut yang sesuai (dengan variasi 5 macam konsentrasi), diinkubasi selama 4 menit pada suhu kamar (15 – 30 °C)¹³ sebelum penambahan GSH dan DCNB atau AE. Khusus Pgv-0, larutan awal dibuat dalam dimetilsulfoksida, pengenceran selanjutnya menggunakan etanol. Asam mefenamat dan piroksikam dilarutkan dalam akuades. Masing-masing konsentrasi diulangi sebanyak 4 kali.

4. Analisis Hasil

Dari reaksi konjugasi antara GSH dengan: DCNB atau AE yang masing-masing dikatalisis oleh GST (yang terdapat dalam fraksi sitosol hati tikus) diperoleh *rate* = Δ serapan/menit.

Aktivitas GST tanpa penambahan senyawa uji (V_0) dan dengan penambahan senyawa uji (V_i) diperoleh menggunakan rumus : $V_0 = \text{rate} / \Delta \epsilon \text{ GS-CNB}$ atau $D e \text{ GS-AE} \times \text{tebal}$ larutan dalam kuvet/ kadar protein enzim dalam mg per mL. Dengan cara yang sama, dapat dihitung nilai V_i menggunakan *rate* yang dihasilkan dari reaksi konjugasi setelah campuran inkubasi diberi inhibitor (Pgv-0 atau asam mefenamat atau piroksikam), dan dilakukan dengan cara yang sama seperti pada V_0 .

$$\Delta \epsilon \text{ GS-CNB} = 8,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\Delta \epsilon \text{ GS-AE} = 5,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Selanjutnya, nilai % inhibisi dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{V_0 - V_i}{V_0} \times 100 \%$$

Kemudian dibuat persamaan garis regresi linier yang menyatakan hubungan antara seri konsentrasi senyawa uji (senyawa inhibitor) vs % inhibisi yang dihasilkan pada taraf kepercayaan 95% dan ditentukan nilai koefisien korelasinya (r). Nilai IC_{50} diperoleh menggunakan persamaan garis regresi linier tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas spesifik GST kelas mu hati tikus yang diperoleh pada penelitian ini adalah $17,73 + 0,84$ nanomol/menit/mg protein. Pada penambahan piroksikam dengan konsentrasi akhir dalam medium inkubasi: 10, 20, 30, 40, dan 50 mM, dihasilkan persentase inhibisi aktivitas GST kelas mu hati tikus (terhadap kontrol) berturut-turut adalah 15,69; 26,19; 32,51; 42,05; dan 62,88 % (memberi korelasi signifikan dengan nilai $r = 0,974$ pada $p \geq 0,05$ dan $db = 3$). Nilai IC_{50} piroksikam terhadap aktivitas GST kelas mu hati tikus adalah 42,66 mM. Selanjutnya, uji aktivitas GST dengan penambahan Pgv-0, pada konsentrasi akhir dalam medium inkubasi: 1, 2, 3, 4, dan 5 μ M menghasilkan % inhibisi aktivitas GST kelas mu hati tikus (terhadap kontrol) berturut-turut adalah: 11,24; 23,97; 31,69; 56,57; dan 63,71 % (memberikan korelasi signifikan dengan nilai $r = 0,983$ pada $p \geq 0,05$ dan $db = 3$). Nilai IC_{50} Pgv-0 terhadap aktivitas GST kelas mu hati tikus adalah 3,91 mM.

Razdan dan Sugden¹⁴ pernah mensintesis senyawa Pgv-0 tersebut dan digunakan sebagai indikator asam-basa. Sejak tahun 1997, Pgv-0 mulai dikembangkan sebagai senyawa antiinflamasi, antioksidan, dan antibakteri oleh Tim Molnas Fakultas Farmasi UGM, hingga akhirnya mendapat Patent di USA dengan Patent No. : US 6,777, 447 B2, tanggal 17 Agustus 2004¹⁵.

Pada penelitian terdahulu (*in vitro*) menggunakan tikus Wistar sebagai hewan uji, Pgv-0 pernah terbukti sebagai inhibitor GST hati tikus kelas umum (alpha, mu, dan pi) seperti yang dilaporkan oleh Sudiby dan Endah¹⁶, dan sebagai inhibitor GST kelas mu hati tikus^{17, 18}. Peneliti terdahulu Rosalia¹⁹, menggunakan GST yang diisolasi dari hati tikus jantan strain Wistar juga melaporkan bahwa Pgv-0 terbukti menghambat sangat kuat GST kelas mu hati tikus dengan nilai $IC_{50} = 4,51$ mM. Sementara itu, percobaan *in vivo* juga melaporkan bahwa Pgv-0 menghambat GST kelas mu hati tikus Wistar (dibanding kontrol)²⁰.

Dari hasil penelitian-penelitian tersebut di atas, nampaknya Pgv-0 menunjukkan spesifisitas yang tinggi sebagai inhibitor terhadap GST kelas mu hati tikus jantan strain Wistar maupun strain Sprague-Dawley. Pada penelitian jangka panjang informasi

tersebut dapat digunakan sebagai dasar pengembangan Pgv-0 sebagai suplemen obat sitostatik elektrofilik pada pengobatan kanker jenis tertentu yang disertai peningkatan aktivitas GST kelas mu. Pada jenis kanker tersebut obat sitostatik sering kurang efektif²¹, mengingat sebagian besar obat sitostatik justru dimetabolisme oleh GSH dengan katalis GST yang berlebihan tersebut (kelas mu) dengan akibat sering dijumpainya resistensi sel kanker terhadap jenis sitostatik tertentu²².

Pada penelitian ini diperoleh nilai aktivitas GST kelas pi hati tikus = $14,85 + 0,43$ nanomol/menit/mg protein. Penambahan piroksikam dengan konsentrasi akhir dalam medium inkubasi: 60, 70, 80, 90, dan 100 μ M, menghasilkan persentase inhibisi aktivitas GST kelas pi hati tikus (terhadap kontrol) berturut-turut adalah 3,80; 10,12; 22,08; 33,78; dan 53,12 % (memberi korelasi signifikan dengan nilai $r = 0,984$ pada $p \geq 0,05$ dan $db = 3$). Nilai IC_{50} piroksikam terhadap aktivitas GST kelas pi adalah 100,79 μ M. Pada uji Pgv-0 terhadap aktivitas GST kelas pi dengan konsentrasi akhir dalam medium inkubasi: 10, 20, 30, 40, dan 50 μ M, dihasilkan persentase inhibisi aktivitas GST kelas pi hati tikus (terhadap kontrol) berturut-turut adalah 16,22; 18,30; 19,02; 17,87; dan 18,15 %. Hasil tersebut menunjukkan ketidakteraturan pola inhibisinya, dengan demikian nilai IC_{50} tidak dapat dicapai. Pada penelitian ini, konsentrasi Pgv-0 tidak mungkin lagi ditingkatkan, karena keterbatasan kelarutan Pgv-0 dalam medium inkubasi (Sudiby, 2005).

Peneliti terdahulu (*in vitro*) menggunakan tikus jantan strain Wistar (berbeda dengan penelitian ini), melaporkan bahwa hingga konsentrasi 40 μ M Pgv-0 hanya menghasilkan penghambatan aktivitas GST kelas pi ginjal tikus sebesar 11%²³. Sementara pada percobaan *in vivo* terhadap tikus Wistar, Pgv-0 menghambat lemah GST kelas pi hati tikus, namun efek penghambatannya tidak tergantung pada dosis yang diberikan (*non-dependent dose*)²⁴. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini (menggunakan tikus strain Sprague-Dawley) bahwa nampaknya Pgv-0 memang tidak menghambat GST kelas pi hati tikus Wistar dan Sprague-Dawley, baik pada percobaan *in vitro* maupun *in vivo*.

Pada uji asam mefenamat terhadap aktivitas GST kelas mu dengan konsentrasi akhir dalam medium inkubasi: 70, 80, 90, 100, dan 110 mM,

dihasilkan persentase inhibisi aktivitas GST kelas mu hati tikus (terhadap kontrol) berturut-turut adalah: 2,56; 12,82; 19,05; 28,21; dan 65,93% (memberikan korelasi signifikan dengan nilai $r = 0,923$ pada $p \geq 0,05$ dan $db = 3$). Nilai IC_{50} asam mefenamat terhadap aktivitas GST kelas mu adalah 107,09 mM. Untuk uji aktivitas GST kelas pi, pada penambahan asam mefenamat dengan konsentrasi akhir dalam medium inkubasi: 20, 40, 60, 80, dan 100 μ M, dihasilkan persentase inhibisi aktivitas GST kelas pi hati tikus (terhadap kontrol) berturut-turut adalah 0,93; 3,13; 5,49; 12,17; dan 16,14% (memberikan korelasi signifikan dengan nilai $r = 0,978$ pada $p \geq 0,05$ dan $db = 3$). Nilai IC_{50} asam mefenamat terhadap aktivitas GST kelas pi adalah 275,0 mM (ekstrapolasi). Hingga kini penulis belum menjumpai studi asam metafenamat terhadap aktivitas GST, dengan demikian belum dapat dibuat pembahasan yang lebih komprehensif.

Mengingat GST kelas mu dilaporkan terlibat dalam pembentukan mediator inflamasi seperti leukotrien³ dan prostaglandin², nampaknya penghambatan aktivitas GST oleh ketiga obat NSAID yang diuji tersebut dapat digunakan sebagai bagian dalam menjelaskan mekanisme antiinflamasi ketiga obat tersebut. Namun, tentu saja masih memerlukan penelitian lanjutan secara *in vivo*, mengingat dalam percobaan *in vivo* banyak enzim yang terlibat pada proses saat obat masuk ke dalam tubuh.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa obat AINS yang diuji ketiganya menghambat GST kelas mu hati tikus jantan (strain Sprague-Dawley) dengan urutan kekuatan $Pgv-0 > piroksikam > asam mefenamat$ dan ketiganya menghambat lemah atau tidak menghambat aktivitas GST kelas pi hati tikus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan kepada Proyek Molnas Fakultas Farmasi UGM, atas pemberian Pgv-0 dan bantuan biaya penelitian. Terima kasih juga ditujukan kepada, Novi, Vivi, Nina, dan Gina yang telah membantu penelitian ini. Juga disampaikan ucapan terima kasih kepada PT. Kimia Farma Jakarta atas pemberian asam mefenamat dan piroksikam yang digunakan dalam penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

1. Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, Jermin LS. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to human. *Biochem J*, 1997; 328: 929-35.
2. Ujihara M, Tsuchida S, Satoh K, Urade Y. Biochemical and immunological demonstration of prostaglandin H₂ by various GSTs isoenzymes. *Arch Biochem. Biophys*, 1988; 264: 428-37.
3. Samuelsson B. The leukotriene: a new group of biologically active compounds including SRS-A. *TIPS*; 1980 (May): 227-30.
4. Nurrochmad, A. Penghambatan biosintesis prostaglandin melalui jalur siklo-oksigenase oleh siklovalon dan tiga senyawa analognya, Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, 1997.
5. Alan RB, Denis B, David MD, Donald SD, Peter IH, Michael LEO, Kevin P, et al. *Therapeutic drug*. Volume 2, 136-7, Edinburg Churchill Livingstone, 1991
6. Vane JR, Botting R. Inflammation and mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 1987;1: 89-96.
7. Hall A, Robson CN, Hikson LD, Harris AL, Proctor SJ, Cattan AR. Possible role of inhibition of glutathione S-transferase in partial reversal of chlorambucil resistance by indomethacin in Chinese hamster ovary cell line. *Cancer Res*, 1989; 49: 6265-68.
8. Bach MK, Brashier JR, Johnson MA. Inhibition by sulfasalazin of LTC synthetase and rat liver GSH S-transferase. *Biochem Pharmacol*, 1985; 34: 2695-704.
9. Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahi MK, Warholm M. et al. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82:7202-206.
10. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 1974; 249(22): 7130-39.
11. Sardjiman SS, Reksahadiprodjo MS, Hakim L, Van der Goot H, Timmerman H. 1,5-Diphenyl-1,4-pentadiene-3-ones and cyclic analogues as antioxidative agents. Synthesis and structure-activity relationship. *Eur J Med Chem*, 1997; 32: 625-30.
12. Lundgren B, Meijer J, Depierre JW. Characterization of the induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases by 2-ethylhexanoic acid in mouse liver. *Drug Metab. Dispos*, 1987;15:114-121.
13. Anonim. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV, hal ii, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 1995.
14. Razdan BK, Sugden JK. *Methods apparatus: New product research, process development and design*. *J Chem Ind*, 1970;(May): 685-86.
15. Reksahadiprodjo MS, Timmerman H, Sardjiman, Supardjan AM, Sudibyo M, Sugiyanto, Hakim L, Nurlaila, Hakim AR, Puspitasari I, Nurrochmad A,

- Purwantiningsih Octari, Yuwono T. Derivatives of benzylidene cyclohexanone, benzylidene cyclopentanone, and benzylidene acetone, and therapeutic uses thereof, USA Patent No. : US 6,777, 447 B2, 2004.
16. Sudibyo M, Endah S. Studi inhibisi senyawa analog kurkumin terhadap aktivitas glutathion S-transferase dengan substrat 1-kloro-2,4-dinitrobenzen. Laporan Proyek Molnas, Kerjasama antara Fakultas Farmasi UGM dengan PT. Kalbe Farma dan PT. Indofarma, 1998.
 17. Sudibyo M, Arief RH. Elusidasi mekanisme antiinflamasi pentagamavu-non-0 melalui penghambatan aktivitas enzim glutathion S-transferase. Gama Sains 2003;V (3): 57-163.
 18. Sudibyo M. Benzylidene cyclopentanone derivatives as inhibitors of rat liver glutathione S-transferase activities. Indo J Chem 2005;5(1):71-75.
 19. Rosalia HK. Pengaruh pentagamavunon-0 pada aktivitas enzim glutathion S-transferase kelas mu liver tikus. Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada 2001.
 20. Sudibyo M, Supardjan AM, Munawiroh SZ. Pengaruh pemberian pentagamavunon-0 pada aktivitas glutathion S-transferase pada hati tikus secara *in vivo*. Sci J Pharm 2004;1(2): 55-63.
 21. Kelley MK, Engqvist-Goldstein A, Montali JA, Wheatly JB, Schmidt Jr DE, Kauvar LM. Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue. Biochem J 1994;304:843-48.
 22. Black SM, Wolf CR. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. Pharmacol Ther 1991;51:139-54.
 23. Ana D. Pengaruh pentagamavunon-0 terhadap aktivitas enzim glutathion S-transferase kelas pi ginjal tikus. Skripsi Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, 2001.
 24. Supardjan, Sudibyo M, Arief RH. Efek pentagamavunon-0 secara *in vivo* terhadap aktivitas glutathion S-transferase kelas mu dan pi pada beberapa organ tikus. Laporan Penelitian Project Grant-QUE Project Batch-2, Fakultas Farmasi UGM, 2002.